

Verfahren und Kit zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*

Die vorliegende Erfindung betrifft Verfahren und Mittel zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in einer biologischen Probe, wobei insbesondere die Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis* und den anderen Mitgliedern des sogenannten *M. tuberculosis*-Komplexes, das sind *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), *Mycobacterium bovis* BCG (*M. bovis* BCG), *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*) und *Mycobacterium microti* (*M. microti*), erreicht wird.

Gegenwärtig sind cirka 2 Milliarden Menschen weltweit mit dem Erreger der Tuberkulose, *M. tuberculosis*, infiziert, wobei jährlich 8 Millionen an Tuberkulose erkranken. Von den an Tuberkulose erkrankten versterben jährlich 3 Millionen. Damit ist die Tuberkulose weltweit zur Zeit die am häufigsten zum Tode führende bakterielle Infektionserkrankung. In den meisten Industrienationen besteht aufgrund der Gefährlichkeit dieser Erkrankung eine sofortige Meldepflicht nach Diagnose einer Tuberkulose, nicht zuletzt um so schnell wie möglich eine Ausbreitung in der Bevölkerung zu verhindern. In den letzten Jahren kann ein vermehrtes Auftreten von Tuberkulose sowohl in den Entwicklungsländern als auch in den Industrienationen beobachtet werden, wobei vor allem bei immunsupprimierten HIV-Patienten dadurch regelmäßig Todesfälle verzeichnet werden. Jedoch nicht nur wegen der allgemeinen Gefahr für große Teile der Weltbevölkerung, sondern auch wegen des inzwischen epidemieartigen Auftretens von mehrfach-resistenten Bakterienstämmen (MDRTB) innerhalb oder außerhalb von Krankenhäusern wird die schnelle und eindeutige Diagnose zum Nachweis von *M. tuberculosis* gefordert.

Beim Menschen wird die Tuberkulose weltweit praktisch ausschließlich durch den humanen Tuberkuloseerreger *Mycobacterium tuberculosis* hervorgerufen. Davon abzugrenzen sind *Mycobacterium bovis* (*M. bovis*), der Erreger der Rindertuberkulose, *Mycobacterium bovis* (BCG), ein attenuierter Stamm von *M. bovis*, der zur Impfung gegen die Tuberkulose verwendet wird, sowie *Mycobacterium africanum* (*M. africanum*) und *Mycobacterium microti* (*M. microti*). Aufgrund ihrer nahen Verwandtschaft werden alle

vorgenannten Spezies im sogenannten *M. tuberculosis*-Komplex zusammengefaßt. Davon wiederum abzugrenzen sind sogenannte nicht-tuberkulöse Mykobakterien. Davon existieren derzeit ca. 100 verschiedene Spezies, von denen wenigstens 30 Spezies in menschlichen Materialien wie Sputum, Stuhl, Urin etc. vorkommen und teilweise auch zu Infektionen bzw. Erkrankungen führen können. Ziel der gegenwärtigen Bemühungen auf dem Gebiet der Mykobakterien-Diagnostik ist daher nicht allein die Bereitstellung von Mykobakterien-Tests, welche es erlauben, eine Mykobakterieninfektion innerhalb kürzester Zeit in einem frühen Infektionsstadium zu erkennen, sondern vielmehr die Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes spezifisch zu identifizieren, und gleichzeitig *M. tuberculosis* von anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes zu unterscheiden.

Eine Identifizierung der Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes sowie die Unterscheidung zwischen *M. tuberculosis* und den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes kann normalerweise durch Testen der Nitratreduktase-Aktivität und Niacin-Akkumulation der Mykobakterien erfolgen (z.B. Metchock B.G. *et al.* In: Manual of Clinical Microbiology. ASM Press, Washington DC, 1999: 399-437). Dabei zeichnet sich *M. tuberculosis* im Vergleich zu den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes durch eine erhöhte Nitratreduktaseaktivität aus. Um den Nitratreduktase-Test durchzuführen, ist aber vor allem die Kultivierung der aus dem klinischen Material isolierten Mykobakterienstämme, insbesondere also tuberkulöser Erregerstämme im Labor erforderlich, was normalerweise allein in speziell für die Kultivierung hochinfektöser Erreger ausgestatteten Labors möglich ist und wegen des langsamen Wachstums der Erreger mehrere Wochen dauert. Die Verfügbarkeit solcher Tests in der klinischen Routinediagnostik ist daher mit einem hohen labortechnischen und finanziellen Aufwand verbunden.

Alle bisher bestehenden Nachweismethoden werden als unbefriedigend und deshalb verbesserungswürdig angesehen. Aus dem Stand der Technik ist bisher kein für den klinischen Routineeinsatz geeignetes Verfahren bekannt, das sich insbesondere durch einfache Anwendung auszeichnet und mit dem es gelingt, die Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes spezifisch in klinischem Material wie Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Knochenmark, Blut oder in Biopsien nachzuweisen und gleichzeitig

M. tuberculosis von den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes zu unterscheiden.

Es ist bekannt, dass der Einsatz der Echtzeit-PCR („Rapid-Cycle-PCR“), die beispielsweise mit einem lufttemperierten System ausgestattet ist und somit wesentlich geringere Transitionszeiten gegenüber einer herkömmlichen PCR aufweist, zu einer deutlich verminderten Zeit bis zum Nachweis von beispielsweise Mykobakterien mittels Amplifikation des isolierten genetischen Materials der Mykobakterien führt (Chapin und Lauderdale, J. Clin. Microbiol. (1997) 35:2157-2159). Darüber hinaus stellen fluorimetrische Messungen bei der Anwendung farbmarkierter Hybridisierungssonden, insbesondere im Rahmen der Echtzeit-PCR, eine schnelle und empfindliche Methode zum Nachweis amplifizierter Genfragmente dar. Bislang ist es jedoch noch nicht gelungen, einen (Echtzeit-)PCR-Test bereitzustellen, mit dem die Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes spezifisch nachgewiesen werden, und gleichzeitig *M. tuberculosis* von den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes unterschieden wird.

Vor diesem Hintergrund liegt die Aufgabe der vorliegenden Erfindung darin, insbesondere verbesserte Verfahren und Mittel bereitzustellen, welche im Wesentlichen einen besonders schnellen und gleichzeitig spezifischen Nachweis von den Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes ermöglichen und mit denen es gleichzeitig möglich ist, *M. tuberculosis* von den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes zu unterscheiden.

Erfindungsgemäß wird die Aufgabe durch die Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 11, Primer und Primerpaare nach den Ansprüchen 12 bis 17, Hybridisierungssonden und Hybridisierungssonden-Paare nach den Ansprüchen 19 bis 28, durch die Verwendungen nach den Ansprüchen 18 und 29 und insbesondere durch die Kits nach den Ansprüchen 30 bis 35 bzw. den Gegenstand der Ansprüche 36 bis 51 gelöst.

Die vorliegende Erfindung betrifft insbesondere ein Verfahren zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis* in einer biologischen Probe, bei dem man

ein Nukleinsäureamplifikationsverfahren durchführt unter Verwendung von Primern, die geeignet sind, einen DNA-Abschnitt aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz zu amplifizieren, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfasst, wobei der DNA-Abschnitt die Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt,

und bei dem man den für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus an der Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons nachweist.

Unter *narGHJI*-Nitratreduktase-Operon wird erfindungsgemäß eine für *narGHJI*-Nitratreduktase kodierende Nucleinsäuresequenz verstanden, einschließlich der regulativen Sequenzen, insbesondere einschließlich seines Promotors. Bei dem für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus handelt es sich um einen gegenüber den Nucleinsäuresequenzen der anderen Mitglieder des *M. tuberculosis*-Komplexes, d.h. *M. bovis*, BCG, *M. africanum* und *M. microti*, spezifischen einzelnen Nucleotidaustausch (T->C), d.h. einen SNP (single nucleotide polymorphism).

In einer Ausführungsform der Erfindung wird in einem ersten Schritt mikrobielle DNA aus der Probe, die bevorzugt klinisches Material ist, extrahiert, und in einem weiteren Schritt mindestens ein DNA-Fragment des Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, das heißt des *narGHJI*-Operons, welches Nitratreduktase codiert, aus der extrahierten DNA amplifiziert, wobei das amplifizierte DNA-Fragment - oder eines der amplifizierten DNA-Fragmente (soweit in der biologischen Probe Vertreter mehrere Mycobakterien-Stämme vorliegen) - eine Zielregion (Target-Sequenz) beinhaltet, welche mindestens einen für *M. tuberculosis* spezifischen DNA-Polymorphismus aufweist.

In einem weiteren Schritt wird die spezifische Hybridisierung des mindestens einen amplifizierten DNA-Fragments mit mindestens einer Hybridisierungssonde, das heißt Oligonucleotid, detektiert, wobei die Hybridisierungssonde eine Nucleotidsequenz umfaßt, die vorzugsweise aus der Gruppe bestehend aus der in SEQ ID NO: 5 dargestellten Nucleotidsequenz, der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 5, der in SEQ

ID NO: 6 dargestellten Nucleotidsequenz und der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 6 ausgewählt ist, und wobei der spezifische Nachweis von *M. tuberculosis* gegenüber anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes, das heißt vor allem *M. bovis*, BCG, *M. africanum* und *M. microti*, mittels Analyse der Schmelztemperatur der spezifischen Hybridisierung der Hybridisierungssonde mit dem amplifizierten DNA-Fragment des *narGHJI*-Operons, das heißt mittels Schmelzkurvenanalyse, erfolgt. Gemäß einer besonderen Ausführungsform weist die Sonde/weisen die Sonde/Sonden die vorgenannte/vorgenannten Nucleotidsequenz/Nucleotidsequenzen auf. Gemäß einer besonderen Ausführungsform werden die vorgenannten Hybridisierungssonden mit der Ankersonde gemäß SEQ ID NO: 4 oder der dazu komplementären Nucleotidsequenz kombiniert.

Erfindungsgemäß bevorzugt ist der mindestens eine *M. tuberculosis*-spezifische DNA-Polymorphismus des *narGHJI*-Operons an Position -215 in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons, das heißt in der Promotorregion, im Folgenden als *narGHJI*-Promotor bezeichnet, lokalisiert. Eingeschlossen sind durch Mutation gebildete Arten von *M. tuberculosis*, die diesen Polymorphismus (T gegenüber C bei den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes) im *narGHJI*-Promotor aufweisen, auch wenn dieser nicht an Position -215 lokalisiert sein sollte sondern an einer im Verhältnis zum Translationsstartcodon GTG des *narGHJI*-Operons anderen Position.

Es wurde überraschenderweise im Rahmen der vorliegenden Erfindung festgestellt, dass an der Stelle des 215ten Nucleotids in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons, das heißt an Position -215 des *narGHJI*-Promotors, bei *M. tuberculosis* eine Thymin-Base zu finden ist, während bei anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes (insbesondere *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG) eine Cytosin-Base vorliegt (vgl. Fig. 1). Dieser Ein-Basen-Polymorphismus ist spezifisch für *M. tuberculosis* und ist vor allem stabil, wie eine vergleichende Untersuchung an über 100 *M. tuberculosis*-Stämmen weltweit bestätigte. Es wurde außerdem unerwarteterweise festgestellt, dass dieser eine Nukleotidpolymorphismus für die unterschiedlichen Reaktion im Nitratreduktasetest von *M.*

tuberculosis im Vergleich zu den anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes verantwortlich ist (s. Beispiel 4).

Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation des DNA-Fragments des *narGHJI*-
5 Operons, mindestens ein Primer, insbesondere mindestens ein Primerpaar, eingesetzt, wobei die Primer die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 2 und/oder die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 3 enthalten, d.h. diese umfassen, insbesondere aber daraus bestehen, d.h. diese aufweisen. Erfindungsgemäß bevorzugt ent-
10 hält das zur spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments bevorzugt eingesetzte mindestens eine Paar markierter Hybridisierungssonden Nucleotidsequenzen, ausgewählt aus der Gruppe der Nucleotidsequenzenpaare der Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4 und in SEQ ID NO: 5, dem Paar der komplementären Sequenzen von SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5, der Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4 und in SEQ ID NO: 6 und dem Paar der komplementären Sequenzen
15 von SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6, insbesondere besteht es daraus.

Der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch Erregerstämme der Art *M. tuberculosis*, das heißt insbesondere der Stämme *M. tuberculosis* H37v (ATCC 25618) und *M. tuberculosis* Erdmann (ATCC 35801) sowie weiterer klinischer Stämme, findet
20 erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 oder dem Paar der komplementären Sequenzen mit einer *narGHJI*-Promotorregion, spezifisch für *M. tuberculosis*, statt. *M. tuberculosis* zeichnet sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 61°C,
25 bevorzugt weniger als 59°C, besonders bevorzugt von etwa 57°C, aus. Dem gegenüber besitzen die Erregerstämme der von *M. tuberculosis* zu unterscheidenden Mykobakterienarten *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG beim Einsatz des markierten Hybridisierungssondenpaars SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 Schmelztemperaturen von insbesondere mehr als 59°C, bevorzugt von mehr als 61°C, besonders bevor-
30 zugt von etwa 63°C.

In Abhängigkeit von den aktuell herrschenden Hybridisierungsbedingungen, beispielsweise von der Pufferzusammensetzung, von der Ausführung der Sonden als markierte Sonden oder durch Modifizierung der Nucleotidsequenz der Sonden kann es zu (meist geringen) Änderungen der absoluten Schmelztemperaturen kommen; selbstverständlich stellen alle diejenigen Verfahren, bei denen derart geänderte Schmelztemperaturen auftreten, bevorzugte Ausführungsformen hier vorgestellter erfindungsgemäßer Verfahren dar.

In einer weiteren Variante findet der eindeutige Nachweis einer tuberkulösen Infektion durch Erregerstämme der Art *M. tuberculosis*, das heißt insbesondere der Stämme *M. tuberculosis* H37v (ATCC 25618) und *M. tuberculosis* Erdmann (ATCC 35801) sowie weiterer klinischer Stämme, erfindungsgemäß bevorzugt durch Analyse der Schmelztemperaturen der spezifischen Hybridisierung eines markierten Hybridisierungssondenpaars mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6 oder dem Paar der komplementären Sequenzen mit einer *narGHJI*-Promotorregion spezifisch für *M. tuberculosis* statt (vgl. Tab. 1). Die Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* zeichnen sich dabei durch Schmelztemperaturen von insbesondere mehr als 58°C, bevorzugt mehr als 60°C, besonders bevorzugt von etwa 62°C aus. Demgegenüber besitzen die Erregerstämme von *M. africanum*, *M. microti*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG beim Einsatz des markierten Hybridisierungssondenpaars SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 Schmelztemperaturen von insbesondere weniger als 62°C, bevorzugt von weniger als 60°C, besonders bevorzugt von etwa 58°C.

Die erfindungsgemäße Nukleinsäureamplifikation kann beispielsweise durch Polymerase-Kettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR), Nukleinsäuresequenz-basierte Amplifikation (*nucleic acid sequence based amplification*, NASBA), Strangverdrängungsamplifikation (*strand displacement amplification*, SDA) oder Ligase-Kettenreaktion (*ligase chain reaction*, LCR) erfolgen. Daneben kommen selbstverständlich beliebige weitere Nukleinsäureamplifikationsverfahren in Betracht.

Ferner wurde überraschenderweise festgestellt, dass bei der Verwendung von mindestens einem Primer, insbesondere eines Primerpaares, umfassend die Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 2 und/oder umfassend die Nucleotidsequenz darge-

stellt in SEQ ID NO: 3, zur Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, die Amplifikation lediglich bei Erregerstämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes erfolgt, das heißt zu einem Amplifikationsprodukt führt. Bei nicht-tuberkulösen Erregern oder nicht-mykobakteriellen Erregern findet hingegen keine Amplifikation statt, das heißt, es wird kein entsprechendes Amplifikationsprodukt erhalten. Durch die Verwendung der erfindungsgemäßen Primer gelingt dabei besonders vorteilhaft die eindeutige Unterscheidung zwischen den Erregerstämmen *M. tuberculosis* und anderen Erregerstämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes (s.o.) sowie gegenüber nicht-tuberkulösen Mycobakterien und nicht-Mykobakterien, beispielsweise Actinomyceten, Erregern der Gattungen *Bacillus*, *Staphylococcus*, *Listeria*, *Enterococcus* sowie *Proteus*, *E. coli*, *Salmonella*, *Shigella*, *Klebsiella* oder *Pseudomonas* oder pilzlichen Erreger.

In einer bevorzugten Ausführungsform der vorgenannten Verfahren wird die Amplifikation der DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) durchgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform ist die PCR eine Echtzeit-PCR (Rapid-Cycle-PCR).

Der Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus kann erfindungsgemäß durch spezifische Hybridisierung von einer oder mehreren Sonden erfolgen.

Im Echtzeit-PCR Verfahren ist es möglich, die Vervielfachung der PCR-Produkte in Echtzeit Amplifikations-Zyklus für Amplifikations-Zyklus zu beobachten. Besonders bevorzugt wird die Amplifikation in einem LightCycler™-System der Firma Roche Molecular Biochemicals durchgeführt, das eine Ausgestaltung der Echtzeit-PCR ist. Zu diesem Zweck werden insbesondere der PCR-Ausgangsmischung neben der Polymerase, den Nucleotiden, den Pufferlösungen und den Primern auch Hybridisierungssonden zugegeben, die spezifisch an die gewünschten PCR-Amplifikationsprodukte binden. Dabei werden insbesondere zwei sequenzspezifische Oligonucleotidsonden verwendet, die mit verschiedenen Farbstoffen markiert sind. Die Sequenzen der erfindungsgemäßen markierten Hybridisierungssonden-Paare sind so ausgewählt, dass sie auf eine Weise an die Zielsequenzen des amplifizierten DNA-Fragments hybridisieren, dass insbesondere das 3'-Ende der einen Sonde dicht bei dem 5'-Ende der anderen Sonde liegt, wo-

durch die beiden Farbstoffe in unmittelbare Nachbarschaft zueinander gebracht werden, vorzugsweise beträgt der Abstand zwischen den beiden Sonden zwischen 1 und 5 Nucleotide. Insbesondere kommt es zu einem Fluoreszenz-Resonanz-Energietransfer (FRET; vgl. z.B. Heid et al., Genome Res. 6 (1996) 986-994) zwischen den beiden Farbstoffen der Hybridisierungs sonden und damit zu einer Verschiebung des Fluoreszenzspektrums, wobei das Maß an Fluoreszenz in diesem Wellenlängenbereich eine Funktion der Menge an detektierter DNA ist. Die Detektion kann beispielsweise nach dem Verfahren gemäß WO 00/58505 erfolgen.

- 10 Durch das FRET-System sind erfindungsgemäß auch quantitative Messungen der Menge amplifizierter DNA-Fragmente vorgesehen. Die erfindungsgemäßen ausgewählten Hybridisierungs sonden können quantitativ, also stöchiometrisch, an die amplifizierten Fragmente binden. Dabei ist die quantitative Hybridisierung insbesondere abhängig von der Temperatur und dem Homologiegrad der verwendeten Oligonucleotidsonden mit der detektierten Sequenz auf dem amplifizierten DNA-Fragment.
- 15

In einer bevorzugten Ausführungsform wird die fluorimetrische Detektion spezifischer DNA-Sequenzen in den amplifizierten Fragmenten nach einer Amplifikation der Fragmente mittels herkömmlicher PCR durchgeführt. In einer besonders bevorzugten Ausführungsform wird die fluorimetrische Detektion in einer Echtzeit-PCR während der Amplifikationsreaktionen durchgeführt, wobei beispielsweise die Zunahme an produzierter DNA als Zunahme im Fluoreszenzsignal verfolgt werden kann.

20

In einer bevorzugten Ausführungsform des erfindungsgemäßen Verfahrens erfolgt die spezifische Detektion der amplifizierten DNA-Fragmente nach Beendigung der Amplifikationsreaktion, wobei nach Hybridisierung des Hybridisierungssondenpaars, bevorzugt eines FRET-Paars an die zu detektierenden Regionen die Temperatur im Rahmen einer Schmelzkurvenanalyse verändert wird, bevorzugt kontinuierlich erhöht wird, und gleichzeitig die in Abhängigkeit von der Temperatur emittierte Fluoreszenz gemessen wird. Auf diese Weise wird eine Schmelztemperatur bestimmt, bei der die Hybridisierungssonden, insbesondere das eingesetzte FRET-Paar, gerade nicht mehr an die zu detektierende Region des amplifizierten DNA-Fragments hybridisieren. Der wesentliche Aspekt einer Schmelzkurvenanalyse besteht darin, dass es bei Auftreten von Fehlpaar-

25

30

runge zwischen dem eingesetzten Hybridisierungssondenpaar und der Zielregion auf dem amplifizierten DNA-Fragment zu einer Reduktion des gemessenen Schmelzpunktes kommt. Auf diese Weise werden erfindungsgemäß mit Hybridisierungssonden, insbesondere mit einem FRET-Paar, die Regionen von DNA-Fragmenten identifiziert, deren Sequenzen sich voneinander insbesondere nur geringfügig, durch eine oder wenige Punktmutationen, in der Nucleotidsequenz unterscheiden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter den Begriffen „Abschnitt“, „Region“, „Fragment“, „Zielregion“ oder „flankierende Region“ mindestens ein zusammenhängender Bereich auf einem linearen, strangförmigen Desoxy- oder Ribonucleinsäuremolekül, das heißt DNA oder RNA, verstanden, welcher, in der Anzahl der Nucleotide dieses Moleküls gemessen, in 5' zu 3'-Leserichtung stromabwärts und/oder stromaufwärts von einem bestimmten nummerierten Nucleotid des Moleküls, das heißt einer bestimmten Position, aus bevorzugt 200, 100, 50, 40, 30, 20, 10, 5, 4, 3 oder 2 Nucleotiden des Moleküls besteht.

Ein erfindungsgemäßer amplifizierter DNA-Abschnitt hat, zusätzlich zu der Sequenz an die der Primer bindet, vorzugsweise eine Länge von mindestens 1 und höchstens 500 Nukleotiden, bevorzugt höchstens 300 und besonders bevorzugt höchstens 155 Nukleotiden. Einzelne Längenwerte, die innerhalb der vorgenannten Bereiche liegen, sind ausdrücklich eingeschlossen, d.h. 2, 3, 4, 5, ..., 497, 498 und 499. Der amplifizierte DNA-Abschnitt kann selbstverständlich auch länger sein, wobei kürzere Abschnitte in der Praxis bevorzugt sein dürften.

Gemäß einer Ausführungsform der Erfindung weist das für das Verfahren verwendete Primerpaar mindestens eine der Sequenzen mit der SEQ ID NO:2 und SEQ ID NO:3 oder die komplementären Sequenzen davon auf.

In einer Ausführungsform der Erfindung erfolgt der Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden, wobei eine Sonde an ihrem 3' Ende und die andere-Sonde an ihrem 5'-Ende

markiert ist und die Sonden spezifisch so an das Amplifikat binden, daß ein Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) ermöglicht wird (s.o.).

5 In einer bevorzugten Ausführungsform weist das Sondenpaar die Sequenzen mit der SEQ ID NO:4 und 5, oder die komplementären Sequenzen davon und/oder die Sequenzen mit der SEQ ID NO: 4 und 6, oder die komplementären Sequenzen davon auf.

10 Gegenstand der Erfindung ist ferner ein Verfahren zum gemeinsamen Nachweis von Erregern des *M. tuberculosis*-Komplexes in klinischem Material, wobei die Gegenwart eines Amplifikationsprodukts der *narGHJI*-Promotorregion insbesondere durch mindestens eine Hybridisierungssonde spezifisch für das amplifizierte DNA-Fragment, bevorzugt durch das oben beschriebene Verfahren, detektiert wird und so Erregerstämme des *M. tuberculosis*-Komplexes gegenüber nicht-tuberkulösen Erregern und/oder gegenüber nicht-Mykobakterien nachgewiesen werden. In einer alternativen Variante wird
15 das Auftreten eines Amplifikationsprodukts in an sich bekannter Weise, insbesondere durch elektrophoretische Methoden detektiert. In diesem Zusammenhang kann das Verfahren der vorliegenden Erfindung Teil eines umfassenderen Nachweisverfahrens sein, bei dem weitere, vorzugsweise erregerspezifische (Art- oder Gattungsspezifische) Nachweise durch Nukleinsäureamplifikation entsprechend spezifischer Sequenzabschnitte in parallelen Ansätzen oder in demselben Reaktions-Ansatz, insbesondere
20 im Zusammenhang mit einer Multiplex-PCR, durchgeführt werden.

Ein wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass in einem Nachweisverfahren zur Diagnose von Mykobakterieninfektionen sowohl eine bestehende
25 Infektion mit *M. tuberculosis* gegenüber anderen mikrobiellen Infektionen, eine Infektion mit *M. tuberculosis* gegenüber nicht-tuberkulösen Infektionen, und eine Infektion mit *M. tuberculosis* gegenüber anderen Mitgliedern des *M. tuberculosis*-Komplexes eindeutig, sicher und insbesondere gleichzeitig, bevorzugt in einem einzigen routinediagnostischen Ansatz, erkannt werden kann. Ein weiterer wesentlicher Vorteil des erfindungsgemäßen Verfahrens ist, dass zusätzlich, insbesondere gleichzeitig und eindeutig
30 der Mykobakterienstamm der Art *M. tuberculosis* nachgewiesen und diese Art einzeln identifiziert werden kann. Die erfindungsgemäßen Nachweisverfahren erlauben daher

insbesondere eine eindeutige und sichere Früherkennung einer Tuberkulose und die eindeutige und sichere Früherkennung der Art-Zugehörigkeit isolierter Erregerstämme des *M. tuberculosis*-Komplexes zu *M. tuberculosis*. Dies ermöglicht besonders vorteilhaft eine schnelle und gezielte Therapie des infizierten Organismus.

5

Das erfindungsgemäße Verfahren wird im Wesentlichen in der Routinediagnostik eingesetzt und im Wesentlichen in Routinelabors durchgeführt. Die Durchführung des Verfahrens in speziell ausgestatteten und aufwändig gestalteten Sicherheitslabors für die Kultivierung hochinfektiöser Erregerstämme ist nicht notwendig. Daher kann das

10
erfindungsgemäße Verfahren einer breiten Anwenderschaft zugeführt werden.

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung werden unter klinischem Material im Wesentlichen klinische Proben, das heißt Patientenmaterial wie Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut, aber auch Biopsien, insbesondere Punktat-Biopsien, beispielsweise aus Halslymphknoten, verstanden. Unter

15

klinischem Material werden aber auch Kulturisolate, beispielsweise aus Flüssigkultur verstanden, insbesondere aus Flüssigkultur zur selektiven Kultivierung säurefester Stäbchen insbesondere aus Patientenmaterial.

20

Bevorzugt wird die mikrobielle DNA aus dem klinischen Material in an sich bekannter Weise, insbesondere mittels DNA-Präparationskits wie dem QIAmp™ DNA Mini Kit der Firma Qiagen, extrahiert.

25

Erfindungsgemäß bevorzugt wird die Probe aus der Gruppe klinischer Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut und Biopsien ausgewählt.

Die vorliegende Erfindung betrifft ferner die zur Durchführung der oben angeführten Verfahren benötigten Primer, Primerpaare, Sonden und Sondenpaare.

30

Erfindungsgemäß bevorzugt ist ein Primerpaar, das zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfasst, geeignet ist, wobei der DNA-

Abschnitt die Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt.

Erfindungsgemäß bevorzugt wird zur Amplifikation eines DNA-Fragments mit einem
5 DNA-Polymorphismus des *narGHJI*-Gens spezifisch für Erregerstämme der Art *M. tuberculosis* aus der extrahierten DNA mit einer Länge von 155 bp das Primerpaar verwendet, bei dem der Vorwärtsprimer die Nucleotidsequenzen gemäß SEQ ID NO: 2 und der Rückwärtsprimer die Nucleotidsequenz gemäß SEQ ID NO: 3 umfaßt bzw. aufweist. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist daher auch mindestens ein Oligo-
10 nucleotid-Primer, bevorzugt mindestens ein Oligonucleotid-Primerpaar zur Amplifikation eines DNA-Fragments der *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Gens, enthaltend, insbesondere bestehend aus, Nucleinsäuremolekülen mit Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 2 und/oder SEQ ID NO: 3 bzw. diese Nucleotidsequenzen umfassend.

15

In einer bevorzugten Ausführungsform weist mindestens ein Primer eines Primerpaares die in SEQ ID NO: 2 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon auf oder umfaßt dieselbe.

20

In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform weist mindestens ein Primer eines Primerpaares die in SEQ ID NO: 3 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon auf oder umfaßt dieselbe.

25

In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die Primer eines Primerpaares die in SEQ ID NO: 2 und die in SEQ ID NO: 3 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon auf.

30

Erfindungsgemäße Primer können die in SEQ ID NO: 2 angegebene Sequenz, oder die komplementäre Sequenz davon, oder die in SEQ ID NO: 3 angegebene Sequenz, oder die komplementäre Sequenz davon aufweisen.

Eine Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung eines der oben genannten Primer oder Primerpaares zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*, d.h. durch Amplifikation von in einer biologischen Probe enthaltene *M. tuberculosis*-DNA und spezifischen Nachweis des erhaltenen Amplifikats (s.o.).

5

Die Erfindung betrifft bevorzugt auch Primer und/oder Primerpaare zur Amplifikation der erfindungsgemäß eingesetzten DNA-Fragmente, welche gegenüber den vorgenannten erfindungsgemäßen Primern umfassend die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 2 und 3 jeweils degenerierte, mutierte oder modifizierte Sequenzen oder Frag-
10 mente davon, die mit der jeweiligen Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 2 und 3, wovon sie jeweils abgeleitet sind, hybridisieren, wobei jeweils ein Homologiegrad, bevorzugt über die gesamte Länge der Sequenz, von mindestens 92 %, bevorzugt von mindestens 97%, besonders bevorzugt von mindestens 98 % zu der ursprünglichen Nucleotidsequenz, besteht. Dabei weisen die abgeleiteten Fragmente jeweils eine Se-
15 quenzlänge auf, welche bevorzugt maximal etwa 98% der Länge der Nucleotidsequenz, besonders bevorzugt maximal etwa 95%, maximal etwa 90%, maximal etwa 75%, maximal etwa 50% oder maximal etwa 25% beträgt. Insbesondere bevorzugt ist das abgeleitete Fragment um maximal 10, um maximal 5, um 4, 3, oder 2 Nucleotide oder um ein Nucleotid gegenüber der ursprünglichen Nucleotidsequenz verkürzt.

20

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter dem Begriff „modifizierte Sequenz“ oder „modifizierte Nucleotidsequenz“ eine Nucleinsäuresequenz verstanden, die sich durch Austausch, Inversion, Deletion oder Addition von mindestens einem Nucleotid, auch einem ungewöhnlichen oder synthetischen Nucleotid, von ihrer ur-
25 sprünglichen Sequenz, in mindestens einem Nucleotid, bevorzugt in zwei Nucleotiden, unterscheidet. In diesem Zusammenhang wird unter dem Begriff „modifiziert“ eine Eigenschaft verstanden, die sich auf eine modifizierte Nucleotidsequenz bezieht.

30

Im Zusammenhang mit der vorliegenden Erfindung wird unter den Formulierungen „Primer, welcher die Nucleotidsequenz umfasst“ oder „Hybridisierungssonde, welche die Nucleotidsequenz umfasst“ oder ähnlichen verstanden, dass die jeweiligen Primer und Sonden die Nucleotidsequenzen aufweisen, das heißt, aus den konkret genannten Nucleotidsequenzen allein bestehen. Unter der Formulierung wird auch verstanden,

dass die jeweiligen Primer und Sonden neben den konkret genannten Nucleotidsequenzen gegebenenfalls aus mindestens einer weiteren zusätzlichen Sequenz bestehen. Diese zusätzliche Sequenz flankiert die konkret genannten Nucleotidsequenzen und besitzt eine Sequenzlänge, welche bevorzugt maximal etwa 100% der Länge der konkret genannten Nucleotidsequenz, besonders bevorzugt maximal etwa 75%, maximal etwa 50%, maximal etwa 25%, maximal etwa 10%, maximal etwa 5% oder maximal etwa 2% beträgt. Insbesondere bevorzugt besitzt die zusätzliche Sequenz eine Länge von 10 bis 5 Nucleotiden, von 4, 3, 2 Nucleotiden oder besteht aus einem einzigen Nucleotid.

Eine erfindungsgemäße Hybridisierungssonde ist eine Sonde, die zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.

Ein erfindungsgemäßes Hybridisierungssonden-Paar ist ein Sonden-Paar, das zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens eine Oligonucleotid-Hybridisierungssonde, welche spezifisch mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons hybridisiert, welche das Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 5 oder mit der komplementären Sequenz davon enthält, insbesondere daraus besteht. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4 und in SEQ ID NO: 5 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch eine weitere oder alternative Oligonucleotid-Hybridisierungssonde, welche spezifisch mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons hybridisiert, welche

das Nucleinsäuremolekül mit der Nucleotidsequenz dargestellt in SEQ ID NO: 6 oder mit der komplementären Sequenz davon enthält, insbesondere daraus besteht. Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch mindestens ein Oligonucleotid-Hybridisierungssondenpaar, welches die Nucleinsäuremoleküle mit den Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 4 und in SEQ ID NO: 6 oder mit den komplementären Sequenzen davon enthält, insbesondere daraus besteht.

10 In einer bevorzugten Ausführungsform weist mindestens eine Sonde eines Hybridisierungssonden-Paares die in SEQ ID NO: 4 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon, oder die in SEQ ID NO: 5 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon, oder die in SEQ ID NO: 6 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon auf.

15 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform weisen die Sonden eines Hybridisierungssonden-Paares die in Sequenz ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon, oder die in Sequenz ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon auf.

20 Erfindungsgemäße Hybridisierungssonden können die in SEQ ID NO: 4 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon, oder die in SEQ ID NO: 5 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon, oder die in SEQ ID NO: 6 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweisen.

25 Erfindungsgemäß bevorzugt wird die Detektion der DNA-Fragmente mit den vorgenannten Hybridisierungssonden durchgeführt, welche als FRET-Paare ausgeführt, d.h. markiert, sind, wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner als Donor-Komponente = „Anker-Sonde“ („anchor probe“) ausgeführt ist, die vorzugsweise am 3'-terminalen Nucleotid mit einem Farbstoff, vorzugsweise mit einem Fluoreszenz-Farbstoff, besonders bevorzugt mit Fluorescein assoziiert ist. Erfindungsgemäß sind bevorzugt als Anker-Sonden vorgesehen die Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenz
30 dargestellt in SEQ ID NO: 4 oder die komplementäre Sequenz davon.

Der jeweils andere Hybridisierungssonden-Partner, des Hybridisierungssonden-Paars ist als Akzeptor-Komponente = Sensor-Sonde („sensor probe“) ausgeführt, welche vorzugsweise am 5'-terminalen Nucleotid mit einem weiteren Farbstoff, vorzugsweise mit einem Rhodamin-Derivat assoziiert ist. Erfindungsgemäß sind bevorzugt als Sensor-

5 Sonden vorgesehen die Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen dargestellt in SEQ ID NO: 5, 6 oder die jeweils komplementären Sequenzen davon. In bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsformen ist das Rhodamin-Derivat LightCycler-Red 640®; in weiteren bevorzugten Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat LightCycler-Red 705®; in weiteren bevorzugten
10 Varianten der vorgenannten Ausführungsform ist das Rhodamin-Derivat Cy5. Besonders bevorzugt tragen die für den erfindungsgemäßen artspezifischen Nachweis von *M. tuberculosis* eingesetzten markierten Sensor-Sonden den Farbstoff LightCycler-Red 640® oder LightCycler-Red 705®.

15 Eine weitere Ausführungsform der Erfindung betrifft die Verwendung einer der oben beschriebenen Hybridisierungssonden oder eines der oben beschriebenen Hybridisierungssondenpaare zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*.

Die vorliegende Erfindung umfaßt selbstverständlich auch Mittel, wie z.B. Kits (Vorrichtungen), zur Durchführung eines erfindungsgemäßen Verfahrens.
20

In einer Ausführungsform umfaßt ein Kit mindestens ein Primerpaar, das zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt, geeignet ist, wobei der DNA-Abschnitt die Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt, und/oder
25 mindestens eine Hybridisierungssonde oder ein Hybridisierungssonden-Paar, die bzw. das zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.
30

In einer bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Kit mindestens ein Primerpaar, bei dem die Primer die in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.

- 5 In einer weiteren bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Kit mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar, bei dem die Sonden die in SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 oder die komplementären Sequenzen davon, oder aber die in SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6 oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.
- 10 In einer besonders bevorzugten Ausführungsform umfaßt das Kit sowohl ein Primerpaar, bei dem die Primer die in SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO: 3 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen, als auch ein Hybridisierungssonden-Paar, bei dem die Sonden die in SEQ ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 oder die komplementären Sequenzen davon, oder aber die in SEQ ID NO: 4 und SEQ ID
- 15 NO: 6 oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.

In einer weiteren Ausführungsform umfaßt das Kit zusätzlich weitere, für die Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation und/oder Nachweisreaktion des Amplifikats erforderliche oder nützliche Geräte, Reagenzien und/oder Hilfsmittel.

20

- Ein weiterer Gegenstand der Erfindung ist auch die Verwendung mindestens eines *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus in der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, insbesondere an Position -215 in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Operons,
- 25 zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis*. In einer besonders bevorzugten Variante ist dieser Genomabschnitt dadurch gekennzeichnet, dass er die Nucleinsäuresequenz dargestellt in SEQ ID NO: 1 oder die komplementäre Sequenz davon enthält, insbesondere aus dieser besteht. Bevorzugt erfolgt die erfindungsgemäße Verwendung in mindestens einem PCR-Ansatz mit anschließender oder gleichzeitiger
- 30 Hybridisierung, beispielsweise in einer Echtzeit-PCR oder in an sich bekannten Verfahren der klassischen Hybridisierung, der DNA-Sequenzierung, insbesondere in einem Kapillarsequenziergerät, der allelspezifischen PCR, des OLA („oligonucleotide ligation assay“), des SSCP („single strand conformation polymorphism“) oder der de-

naturierenden Gradienten-Gelelektrophorese (DGGE). Alternative Verfahren zur Amplifikation bestehen dabei neben der PCR beispielsweise in den bekannten Verfahren NASBA, SDA oder LCR.

5 Die Erfindung wird anhand des anhängenden Sequenzprotokolls, das die Sequenzen Nr. 1 bis 6 enthält, anhand der Figuren 1 bis 5 sowie anhand der Beispiele 1 bis 4 näher erläutert.

SEQ ID NO: 1 - Region im Bereich des *narGHJI*-Operons, die den für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus an Position -215 im *narGHJI* Promotor umfaßt;

10

SEQ ID NO: 2 – Vorwärtsprimer zur Amplifikation eines 155 bp-Fragments des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien enthaltend einen DNA-Polymorphismus spezifisch für *M. tuberculosis*,

15 SEQ ID NO: 3 – Rückwärtsprimer zu SEQ ID NO: 2;

SEQ ID NO: 4 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Anker-Sonde und Donor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien;

20

SEQ ID NO: 5 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien;

25 SEQ ID NO: 6 – Hybridisierungssonde (antisense), insbesondere Sensor-Sonde und Akzeptor-Komponente eines Sondenpaars zur Detektion der artspezifischen Region des *narGHJI*-Promotors von Mykobakterien.

30 Beschreibung der Figuren:

Figur 1 - zeigt ein Alignment der *narG* Promotor-Regionen von *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG. Der markierte Bereich zeigt den für *M. tuberculosis* spezifischen Nukleotidpolymorphismus („T“).

- 5 Figur 2 - zeigt Schmelzkurven der Hybridisierung des spezifischen Hybridisierungssondenpaars mit SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 mit der *M. tuberculosis*-spezifischen Region im amplifizierten 155 bp-Fragment des *narGHJ*-Promotors.

- 10 Figur 3 - zeigt Schmelzkurven der Hybridisierung des spezifischen Hybridisierungssondenpaars mit SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 mit der *M. tuberculosis*-spezifischen Region im amplifizierten 155 bp-Fragment des *narGHJ*-Promotors.

- 15 Figur 4 - zeigt einen diagnostischen Nitratreduktasetest bei eigens hergestellten T-215C-Mutanten von *M. tuberculosis*, bei den zugehörigen Wildtypen sowie bei *M. bovis* und *M. bovis* BCG. Die Rotfärbung (dunkel) durch den aus dem Naphtylamid und Sulfanilsäure gebildeten Diazoniumfarbstoff zeigt die Nitritakkumulation im Medium an: Allein die Wildtypen von *M. tuberculosis* weisen eine Nitritakkumulation auf; die T-215C-Mutanten davon besitzen (wieder) den *M. bovis* -Phänotyp.

- 20 Figur 5 - zeigt einen Bereich des *narG* Gens (SEQ ID NO: 1), der den für *M. tuberculosis* spezifischen Nukleotidpolymorphismus (T) an Position -215 strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG aufweist.

25

BEISPIELE

Beispiel 1: DNA-Isolierung

a) aus klinischem Material

Mikrobielle DNA wird aus klinischen Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut oder Punktat-Biopsien in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels eines QIAmp™ DNA Mini Kit (Firma Qiagen, Hilden, Deutschland) aufgereinigt, das heißt extrahiert.

5 b) aus Kulturoisolaten

Kulturen zu diagnostizierender Mikroorganismen aus Patientenproben werden in einem automatisierten Zellkultursystem BACTEC™ MGIT™ (Becton, Dickinson and Company Diagnostic Systems, USA) in Flüssigkulturen unter Bedingungen, welche die Kultivierung säurefester Stäbchen, insbesondere von Mykobakterien, unterstützen, angezüchtet. Aus den positiven Kulturen wird die mikrobielle DNA beispielsweise mittels mechanischer Disruption erhalten. Die mikrobielle DNA wird in an sich bekannter Weise zum Beispiel mittels eines QIAmp™ DNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Deutschland) aus den Kulturoisolaten extrahiert und gegebenenfalls aliquotiert.

Beispiel 2: PCR-Amplifikation

15 Zur Amplifikation in einer optimierten LightCycler™-PCR wird ein Ansatz beinhaltend die fertig erhältliche Mischung „LightCycler FastStart DNA Master Hybridisation Probes“ (Katalog-Nr. 239272, Firma Roche Molecular Biochemicals) gewählt.

Es wird folgende Reaktionsmischung für die LightCycler-Reaktion hergestellt:

- FastStart™ Taq Polymerase
- 20 • Reaktionspuffer
- Desoxi-Nucleosid-Triphosphat-Mischung (dNTP)
- 3 mmol/l MgCl₂ (Endkonzentration)
- Primer, je Primer: 18 pmol, entsprechend 1,1 µmol/l Endkonzentration
- Oligonucleotid-FRET-Sonden-Paar
- 25 je Sonde: 2 pmol, entsprechend 100 nmol/l Endkonzentration

Diese Reaktionsmischung wird durch Puls-Zentrifugation in die Glaskapillaren des LightCycler-Systems verbracht und die Amplifikation nach dem „Hot Start“-Prinzip nach

einer anfänglichen Denaturierung bei 95°C für 10 Minuten mit den folgenden Schritten durchgeführt:

1. Denaturierung bei 95°C für 3 Sekunden
2. Primer-Hybridisierung bei Temperaturen von 68°C bis 62°C für 2 Sekunden
5 („touch-down-annealing“)
3. Polymerisation bei 72°C für 40 Sekunden

Die Schritte 1 bis 3 werden insgesamt 50 mal zyklisch abgearbeitet, wobei für die ersten 5 Zyklen die Hybridisierung in Schritt 2 bei 68°C erfolgt und bei den nachfolgenden 6 Zyklen die Temperatur auf 62°C in Schritten von 1°C pro Zyklus reduziert wird und für
10 die restlichen Zyklen bei 62°C durchgeführt wird. Die Rate der Temperaturänderung liegt bei allen Schritten bei 20°C pro Sekunde.

Zur Amplifikation der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors wird der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 2 als Vorwärtsprimer und der Primer mit der Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 3
15 als Rückwärtsprimer eingesetzt. Es werden 155 bp-Fragmente des *narGHJI*-Promotors amplifiziert. Es zeigt sich weiter, dass die Verwendung dieser Primer lediglich bei Erregerstämmen des *M. tuberculosis*-Komplexes zu einem Amplifikationsprodukt führen, nicht aber bei nicht-tuberkulösen Erregern oder nicht-mykobakteriellen Erregern. Daher lässt die Verwendung der Primer mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 und/oder
20 SEQ ID NO: 3 auch die eindeutige Unterscheidung von Erregern von Arten des *M. tuberculosis*-Komplexes gegenüber Erregern von nicht-tuberkulösen Arten und gegenüber Erregern von nicht-Mykobakterien zu.

Beispiel 3: Detektion und Schmelzkurvenanalyse

Zur Detektion der amplifizierten Fragmente werden in die Reaktionsmischung (siehe
25 Beispiel 2) eingesetzte FRET-markierte Hybridisierungssondenpaare verwendet, wobei jeweils ein Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 4) als Donor-Komponente am 3'-terminalen Nucleotid mit Fluorescein assoziiert ist, und der jeweils andere Hybridisierungssonden-Partner (SEQ ID NO: 5 oder 6 als Akzeptor-Komponente am 5'-terminalen Nucleotid mit LightCycler-Red™ 640 assoziiert ist. Die bei der Detektion mit

den Hybridisierungs sonden unmittelbar nach dem letzten Amplifikationszyklus erfolgende Schmelzkurvenanalyse beginnt mit der Denaturierung der amplifizierten Fragmente bei 95°C für 30 Sekunden, worauf eine Hybridisierung mit den vorgenannten FRET-Paaren bei 38°C für 30 Sekunden folgt. Zur Bestimmung der Schmelzkurve der Hybridisierung wird die Temperatur anschließend kontinuierlich von 38°C auf 80°C mit einer Rate von 0,2°C pro Sekunde erhöht, wobei die von den konjugierten FRET-Paaren emittierte Fluoreszenz kontinuierlich aufgezeichnet wird. Die Fluoreszenz erscheint regelmäßig sobald mindestens ein Hybridisierungssonden-Partner abschmilzt. Zur Auswertung des Fluoreszenzsignals wird das LightCycler-„Run Profile“-Programm in der Version 3.5.3 eingesetzt, wobei die Verstärkung des F2- und F3-Kanals des photometrischen Detektors des LightCycler-Systems automatisch eingestellt wird.

Zur spezifischen Hybridisierung der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors wird das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 eingesetzt. Alternativ wird zur spezifischen Hybridisierung der den *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus enthaltenden Region des *narGHJI*-Promotors das FRET-markierte Hybridisierungssondenpaar mit den Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 eingesetzt.

Die Figuren 2 und 3 und die Tabelle 1 zeigen die Ergebnisse der Schmelzkurvenanalyse.

Beispiel 4: Vergleich des erfindungsgemäßen Verfahrens mit dem herkömmlichen Nitratreduktasetest.

In Vergleichsversuchen wurden verschiedene, *M. tuberculosis*, *M. bovis* und *M. bovis* BCG enthaltende Proben dem erfindungsgemäßen Verfahren sowie dem herkömmlichen Nitratreduktasetest (vgl. Figur 4) unterzogen.

Es wurden folgende Proben eingesetzt, wobei die Probennummern der Nummerierung in Figur 4 entsprechen:

M. tuberculosis:

1. H37Rv Wildtyp;
2. H37Rv *narG* (T-215C);
3. Erdmann Wildtyp;
4. Erdmann *narG* (T-215C);

5

M. bovis:

5. Wildtyp

M. bovis BCG:

6. Wildtyp

10

Die Proben Nr. 1 und 3 wurden unter Verwendung des erfindungsgemäßen Verfahrens (vgl. Beispiele 3 und 4) positiv getestet, d.h. *M. tuberculosis* wurde spezifisch nachgewiesen, wobei eine eindeutige Unterscheidung von den Mycobakterienstämmen Nr. 5 und 6 möglich war. Die Proben 2 und 4, bei denen die für T an Position –215 kodierende Sequenz gentechnisch so modifiziert ist, dass sie für C kodiert, zeigten in der Schmelzkurve niedrigere und mit den *M. bovis* und *M. bovis* BCG enthaltenden Proben 5 und 6 vergleichbare Werte.

15

- 20 Der biochemische Test, Nitratreduktasetest, bestätigte das Ergebnis, wobei die unmodifizierten *M. tuberculosis*-Proben Nr. 1 und 3 positiv getestet wurden, während bei den *M. bovis* und *M. bovis* BCG enthaltenden Proben sowie den Proben, die gentechnisch an Position –215 durch T->C Austausch modifizierte *M. tuberculosis*-Stämme enthielten, keine Farbreaktion beobachtet wurde, was die Signifikanz des Polymorphismus an
- 25 Position –215 für das erfindungsgemäße Nachweisverfahren bestätigt.

Tabelle 1

Art	Stamm	Schmelztemperatur [°C] der Hybridisierungs sonden spezifisch für	
		<i>M. tuberculosis</i> Sonde: SEQ ID NO: 6 Zielregion: <i>narGHJI</i> -Pro.	<i>M. tuberculosis</i> Sonde: SEQ ID NO: 5 Zielregion: <i>narGHJI</i> -Pro.
<i>M. tuberculosis</i>	H37v ATCC 25618	62,3°	56,8°
	Erdmann ATCC 35801	62,2°	57,0°
	klinische Stämme (n = 33)	62,2° (SD = 0,29)	56,9° (SD = 0,36)
<i>M. africanum</i>	klinische Stämme (n = 3)	57,9° (SD = 0,14)	63,4° (SD = 0,21)
<i>M. microti</i>	klinische Stämme (n = 2)	57,0° (SD = 0,14)	63,2° (SD = 0,28)
<i>M. bovis</i>	ATCC 19210	58,2°	63,1°
	klinische Stämme (n = 12)	58,0° (SD = 0,22)	63,2° (SD = 0,30)
<i>M. bovis</i> BCG	Pasteur ATCC 35734	57,9°	63,6°
	Copenhagen ATCC 27290	58,0°	63,5°
	Moreau ATCC 35736	58,2°	63,7°
	Tice ATCC 35743	58,2°	63,5°
	Connaught ATCC 35745	58,2°	63,7°
	klinische Stämme (n = 4)	57,9° (SD = 0,26)	63,2° (SD = 0,26)

Patentansprüche

1. Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in einer biologischen Probe, bei dem man

ein Nukleinsäureamplifikationsverfahren durchführt unter Verwendung von Primern, die geeignet sind, einen DNA-Abschnitt aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz zu amplifizieren, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfasst, wobei der DNA-Abschnitt die Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt

und den für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus an der Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons nachweist.
2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Nukleinsäureamplifikation durch PCR, NASBA, SDA oder LCR erfolgt.
3. Verfahren nach Anspruch 2, dadurch gekennzeichnet, daß die PCR eine Echtzeit-PCR ist.
4. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 3, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus durch spezifische Hybridisierung von einer oder mehreren Sonden erfolgt.
5. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der amplifizierte DNA-Abschnitt eine Länge von mindestens 1 und höchstens 500 Nukleotiden aufweist.

6. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der amplifizierte DNA-Abschnitt eine Länge von mindestens 1 und höchstens 300 Nukleotiden aufweist.
7. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 4, dadurch gekennzeichnet, daß der amplifizierte DNA-Abschnitt eine Länge von mindestens 1 und höchstens 155 Nukleotiden aufweist.
8. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 7, dadurch gekennzeichnet, daß das Primerpaar mindestens eine der Sequenzen mit der SEQ ID NO: 2 und SEQ ID NO:3 oder die komplementären Sequenzen davon aufweist.
9. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 8, dadurch gekennzeichnet, daß der Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden erfolgt, wobei eine Sonde an ihrem 3' Ende und die andere-Sonde an ihrem 5'-Ende markiert ist und die Sonden spezifisch so an das Amplifikat binden, daß ein Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer (FRET) ermöglicht wird.
10. Verfahren nach Anspruch 9, dadurch gekennzeichnet, daß das Sondenpaar die Sequenzen mit der SEQ ID NO: 4 und 5, oder die komplementären Sequenzen davon und/oder die Sequenzen mit der SEQ ID NO: 4 und 6, oder die komplementären Sequenzen davon aufweist.
11. Verfahren nach den Ansprüchen 1 bis 10 dadurch gekennzeichnet, daß die Probe ausgewählt ist aus der Gruppe klinischer Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut und Biopsien.
12. Primerpaar, dadurch gekennzeichnet, daß es zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfasst, geeignet ist, wobei

der DNA-Abschnitt die Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt.

13. Primerpaar nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Primer die in SEQ ID NO: 2 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
14. Primerpaar nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens ein Primer die in SEQ ID NO: 3 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
15. Primerpaar nach Anspruch 12, dadurch gekennzeichnet, daß die Primer die in SEQ ID NO: 2 und die in SEQ ID NO: 3 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.
16. Primer, dadurch gekennzeichnet, daß er die in SEQ ID NO: 2 angegebene Sequenz, oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
17. Primer, dadurch gekennzeichnet, daß er die in SEQ ID NO: 3 angegebene Sequenz, oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
18. Verwendung eines Primers nach den Ansprüchen 16 und 17 oder eines Primerpaares nach den Ansprüchen 13 bis 16 zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*.
19. Hybridisierungssonde, dadurch gekennzeichnet, daß sie zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position –215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.
20. Hybridisierungssonden-Paar, dadurch gekennzeichnet, daß es zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position

–215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.

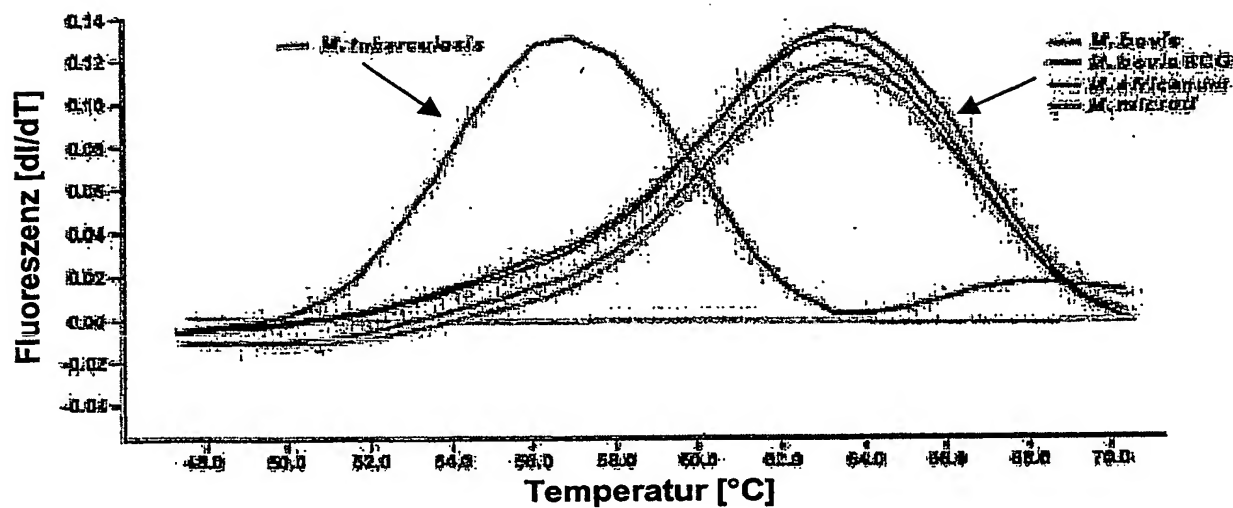
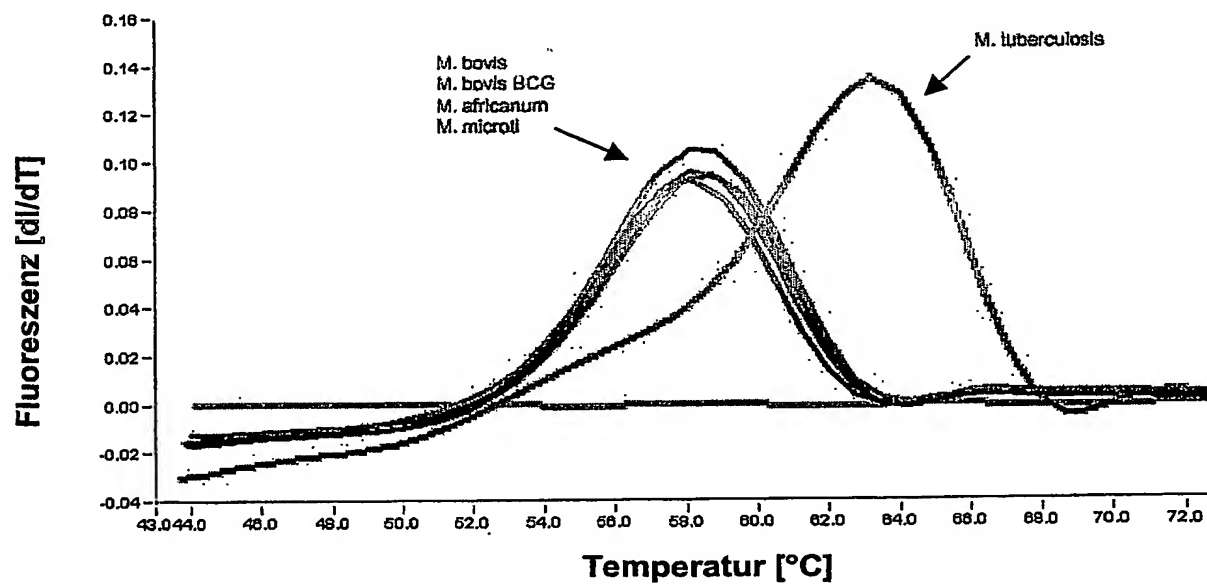
21. Hybridisierungssonden-Paar nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Sonde die in SEQ ID NO: 4 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
22. Hybridisierungssonden-Paar nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Sonde die in SEQ ID NO: 5 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
23. Hybridisierungssonden-Paar nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß mindestens eine Sonde die in SEQ ID NO: 6 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
24. Hybridisierungssonden-Paar nach Anspruch 20, dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden die in Sequenz ID NO: 4 und SEQ ID NO: 5 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.
25. Hybridisierungssonden-Paar nach Anspruch 20 dadurch gekennzeichnet, daß die Sonden die in Sequenz ID NO: 4 und SEQ ID NO: 6 angegebenen Sequenzen oder die komplementären Sequenzen davon aufweisen.
26. Hybridisierungssonde, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 4 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
27. Hybridisierungssonde, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 5 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.
28. Hybridisierungssonde, dadurch gekennzeichnet, daß sie die in SEQ ID NO: 6 angegebene Sequenz oder die komplementäre Sequenz davon aufweist.

29. Verwendung einer Hybridisierungssonde nach den Ansprüchen 26 bis 28 oder eines Hybridisierungssondenpaares nach den Ansprüchen 21 bis 25 zum spezifischen Nachweis von *M. tuberculosis*.
30. Kit zur Durchführung eines Verfahrens nach den Ansprüchen 1 bis 11.
31. Kit nach Anspruch 30, das
- mindestens ein Primerpaar umfaßt, das zur Amplifikation eines DNA-Abschnitts aus der in SEQ ID NO: 1 gezeigten Sequenz, die einen Abschnitt aus dem Bereich des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfasst, geeignet ist, wobei der DNA-Abschnitt die Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons umfaßt und/oder
- mindestens eine Hybridisierungssonde oder ein Hybridisierungssonden-Paar umfaßt, die/das zum spezifischen Nachweis des für *M. tuberculosis* spezifischen Polymorphismus, der an Position -215 in 5' zu 3' Leserichtung strangaufwärts des Translationsstartcodons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist, geeignet ist.
32. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Primerpaar das Primerpaar nach Anspruch 15 ist.
33. Kit nach Anspruch 31, dadurch gekennzeichnet, daß das Hybridisierungssonden-Paar das Sondenpaar nach Anspruch 24 und/oder das Sondenpaar nach Anspruch 25 ist.
34. Kit nach Anspruch 33, dadurch gekennzeichnet, daß das Primerpaar das Primerpaar nach Anspruch 15 ist.

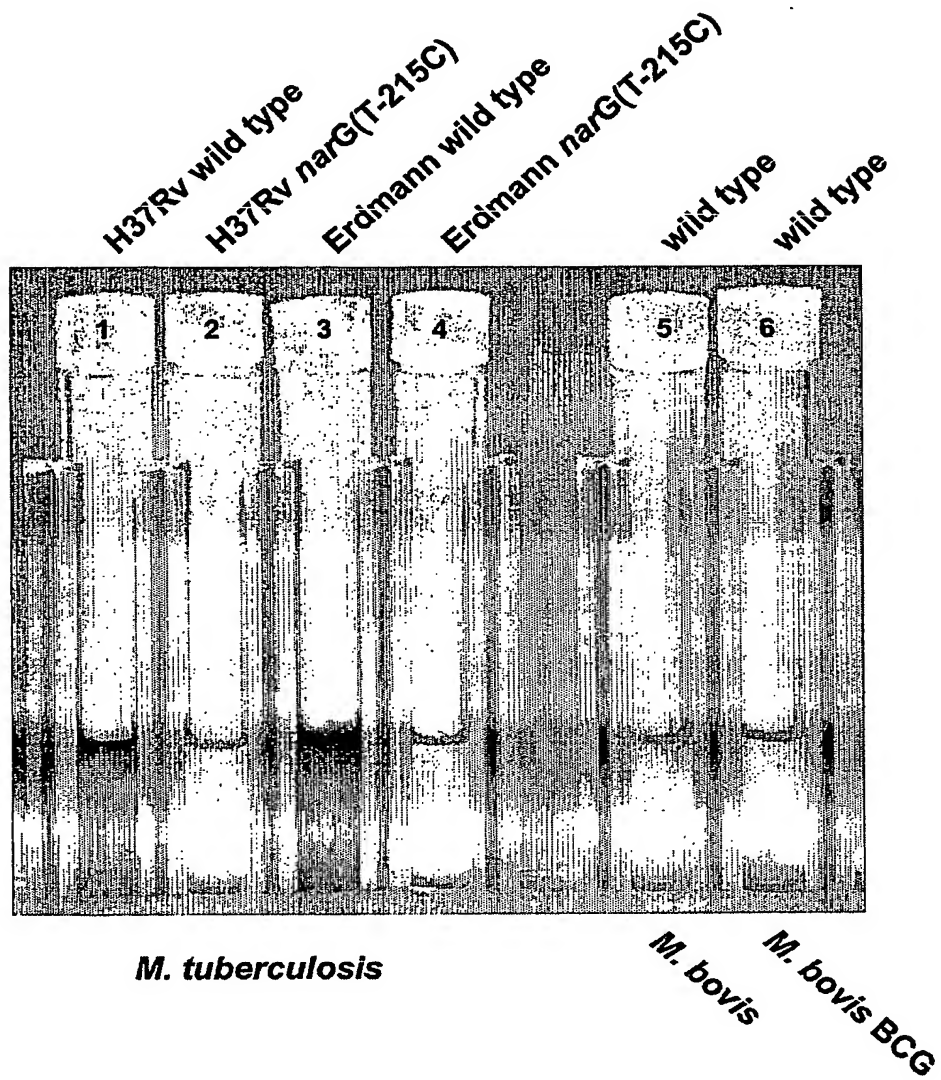
35. Kit nach den Ansprüchen 30 bis 34, dadurch gekennzeichnet, daß es weitere für die Durchführung einer Nukleinsäureamplifikation und/oder Nachweisreaktion erforderliche oder nützliche Reagenzien und/oder Hilfsmittel umfaßt.
36. Verfahren zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* (*M. tuberculosis*) in klinischem Material umfassend die Schritte
- a) Extraktion von mikrobieller DNA aus klinischem Material,
 - b) Amplifikation mindestens eines DNA-Fragments der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien enthaltend eine mindestens einen DNA-Polymorphismus spezifisch für *M. tuberculosis* aus der extrahierten DNA,
 - c) Detektion der spezifischen Hybridisierung des amplifizierten DNA-Fragments mit mindestens einer Hybridisierungssonde, welche die Nucleotidsequenz, ausgewählt aus der Gruppe bestehend aus SEQ ID NO: 5, der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 5, SEQ ID NO: 6 und der komplementären Sequenz zu SEQ ID NO: 6, umfaßt,
- wobei der spezifische Nachweis von *M. tuberculosis* gegenüber *M. bovis*, *M. bovis* BCG, *M. africanum* und *M. microti* mittels Schmelzkurvenanalyse erfolgt.
37. Verfahren nach Anspruch 36, wobei der DNA-Polymorphismus an Position - 215 der Promotorregion in 5' zu 3'-Leserichtung strangaufwärts des Translationsstart-Codons GTG des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons lokalisiert ist.
38. Verfahren nach Anspruch 37, wobei in Schritt b) die Amplifikation mittels eines Primerpaares umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3 erfolgt.
39. Verfahren nach einem der Ansprüche 36 bis 38, wobei in Schritt c) die spezifische Hybridisierung mit mindestens einem Paar markierter Hybridisierungssonden umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon und/ oder die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon erfolgt.

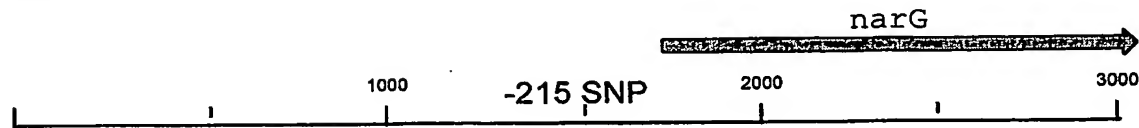
40. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Vervielfachung der DNA-Fragmente mittels Polymerase-Kettenreaktion (PCR) bevorzugt als Echtzeit-PCR, bevorzugt mittels LightCycler™-System, durchgeführt wird.
41. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Schritte spezifischer Hybridisierung während oder nach der Amplifikation der DNA-Fragmente erfolgt.
42. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die spezifische Hybridisierung und deren Detektion in der Echtzeit-PCR, bevorzugt im LightCycler™-System erfolgt.
43. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei die Detektion der spezifischen Hybridisierung mittels Fluoreszenznachweis durchgeführt wird und wobei die markierten Hybridisierungssonden-Paare als Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfer(FRET)-Paar ausgebildet sind.
44. Verfahren nach einem der vorstehenden Ansprüche, wobei das klinische Material ausgewählt ist aus der Gruppe klinischer Proben bestehend aus Sputum, Bronchiallavage, Magensaft, Urin, Stuhl, Liquor, Knochenmark, Blut und Biopsien.
45. Oligonucleotid-Primerpaar, zur Amplifikation eines DNA-Fragments der *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Gens, umfassend Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3.
46. Oligonucleotid, welches mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons spezifisch hybridisiert umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 5 oder die komplementäre Sequenz davon.
47. Oligonucleotid, welches mit einer *M. tuberculosis*-spezifischen Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons spezifisch hybridisiert umfassend die Nucleotidsequenz SEQ ID NO: 6 oder die komplementäre Sequenz davon.
48. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
49. Oligonucleotid-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.

50. Kit zum spezifischen Nachweis von *Mycobacterium tuberculosis* umfassend
- a) mindestens ein Primerpaar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 2 / SEQ ID NO: 3, und
 - b) mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 5 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon und/oder mindestens ein Hybridisierungssonden-Paar umfassend die Nucleotidsequenzen SEQ ID NO: 4 / SEQ ID NO: 6 oder das Paar der komplementären Sequenzen davon.
51. Verwendung mindestens eines *M. tuberculosis*-spezifischen DNA-Polymorphismus in der Promotorregion des *narGHJI*-Nitratreduktase-Operons von Mykobakterien, enthaltend die Nucleinsäuresequenz dargestellt in SEQ ID NO: 6 oder die komplementäre Sequenz davon, zum spezifischen Nachweis einer Infektion mit *M. tuberculosis*

**Figur 2****Figur 3**

Figur 4: Nitratreduktasetest: *M. tuberculosis* Wildtyp und Mutanten, *M. bovis* und *M. bovis* BCG im Vergleich



Figur 5 -215 SNP mit 1500 bp flankierenden Sequenzen

1500 Basen vor und hinter dem -215 SNP („T“) im Promotor des narGHJI-Operons:

CTCGGGTGTCAAGTTGACGCCGGCGATTACCGCTGTCTACCTCGTCGGCGTTTCGGCGGTT	60
GCATGCGGCCGCAATTTTCGGTGGTTCGTGTTCTTGCCACCGTCGGCGTGTCTACTGGT	120
CGTCGGCGATGAAGCCCGCTACTACTTCACCGACCTGTTGGGCGACGCAGGCCGGGTGG	180
GCCCATCGCCACCTCCTTCAATCAATCCTGGCGCGGCGGATTTCCTGGATTCTCGGTCA	240
CGACGCCGGTTTTGGTCCGCTGGTCTGGCTGCGATCGCCAGTACGGCGGTATTGGCCAT	300
CCTGGCCTGGCGTGCCTCGACAGGTCCGATCGGCTGGGCAAACCTATTGGTGGTTCGAGTT	360
GTTTCGGCCTGCTGCTCTCGCCGATCTCCTGGACTCACCCTGGGTGTGGCTAGTGCCGCT	420
GATGATCTGGCTGATTGACGGGCCAGCGCGTGAGCGCCCGGGCGCCCGGATTTTGGGCTG	480
GGGCTGGTTGGTGTGACCATCGTCGGCGTGCCGTGGTTGCTGAGCTTTGCTCAACCGAG	540
CATCTGGCAAATCGGCCGGCCGTGGTATTTGGCCTGGGCCGGTCTGGTCTACGTGGTGGC	600
GACGCTGGCGACCTTGGGCTGGATCGCCGCCCTCCGAGCGTTACGTGCGCATTTCGGCCGCG	660
GCGCATGGCCAATTAGGCCCCAAACATTGCGTCGATATCGTGCGCCATCGCAATGTCGTT	720
TTCCGTGATACCACTACCGCATGCGTAACGAGCGCGAAAGTTACTGTTTCGCCAACGGAT	780
ATCGATGTCGGGATGATGATTTACCTCCTCGGCTCGCTCGGCCACCCGGCGTACGGCGTC	840
GATACCGGCCATAAACGTCGGAAACTTGATTGACCTACGCAGGACACCACCGGCGCGCTG	900
CCAGCCGTTGAGGTTCGTGCGAGTGCAGGCGTGCACCTGCTCATCCGTTAACACAGCCATACC	960
TCGACGGTATACCGTCACAGGTCATGCTGAATCAGATCGTGGTTGCCGAGCCATCGTCC	1020
GCGGTTGCACGGTCTTGGTGGCGCAACGCGTTCGGCCACCGGAGTTGGCGGGTCGTGGG	1080
AACTTCCCGCGGTAAGGTCGCCGCCGGCGAAACCGAGCGCGCCGCGCTGGCCCCGAGAGC	1140
TCGCCGAAGAACTGGGACTCGAGGTCGCCGACCTCGCGGTGGGCGACCGTGTGGGCGACG	1200
ATATTGCGTTGAACGGCACGACGACGCTGCGGGCCTATCGCGTGCATCTGCTTGGCGGCG	1260
AACCGCGTGCAGTGCACCGCGGCGCTGTGCTGGGTGACGGCGGCCGAACCTGCACGATG	1320
TCGACTGGGTACCAGCCGACCGCGGCTGGATTGCGGACCTGGCGCGAACCTCAACGGGT	1380
CCGCCGAGATGTCCACCGTCGCTGTTAGGAAACCGACGGTGTGGTTGACGGTGGCCGCG	1440
GTCAACTTGGTTAGAACAACGTGACAAAACGTTAAGTTGGGTTTGATGCCCCGTAGCGAT	1500
TACGATGGTTTTCTGAGACGCGTGGCGACAACCTTCGGGCGAGGACGCTGACGCCCCATCCAT	1560
CGAGATACCCGATGTTGACGAGAGGGGTCCCCGACCCGGCGGACCGGGGCTTGACGGGCG	1620
CAATGCGGCGCGGCCGGCCAGCCCGTAACGTCCAGCGAGTGCAGTGCAGCGCCGACGGCC	1680
CGGCCCCACACCGCTCATGACGAGGAGGGTCATCCCGTGACCGTTACACCTCACGTCGGT	1740
GGACCGCTCGAAGAGCTGCTGGAGCGCAGCGGGCGCTTCTTACCCAGGTGAGTTCTCG	1800
GCCGACCTGCGCACCGTAACCGGCGCGGCGGCCGGAAGGTGACGTGTTCTACCGCGAT	1860
CGGTGGAGTCACGACAAAGTGGTCCGATCCACGCACGGAGTCAACTGCACCGGATCCTGC	1920
TCATGGAAGATCTACGTCAAAGACGGGATCATCACCTGGGAAACCCAGCAGACCGACTAC	1980
CCGTCGGTGGGCCCCGACCGGCCGAATACGAGCCACGAGGTTGTCCCCGTGGCGCGTGC	2040
TTCTCCTGGTACAGCTATTTCGCCGACGCGGGTGCCTATCCGTATGCCCGGGGCGTGCTG	2100
GTTGAGATGTACCGGAAGCCAAGACCCGCCTGGGCGACCCGGTGCTGGCGTGGGCCGAC	2160
ATTGAGCGGATCCCGAGCGCAGACGCCGCTATCAACAGGCCCGCGCAAGGGTGGGCTG	2220
GTCGGGTGAGTGGGCGAGGCCAGCGAGATGGTGGCCGCCGCCACGTGCACACCATC	2280
AAGACATACGGCCCCGACCGGGTCGCCGGCTTCTCGCCGATTCCGGCGATGTCAATGGTC	2340
AGCCATGCCGCGGGGTCCCGGTTCTGAGGCTGATCGGCGGCGTGATGACGTCGTTCTAC	2400
GACTGGTACGCCGACTTGCCGGTGGCCTCGCCGAGGTGTTTCGGCGACCGACCGACGTG	2460
CCCGAATCCGGCGACTGGTGGGATGCGTCGTATTTGGTTCATGTGGGGCTCCAACGTCCCG	2520
ATCACCCGACGCCCCGACGCACATTGGATGGCGGAGGCCGTTACCGCGGCGCTAAAGTC	2580
GTTGTCGTGAGCCCGACTACGCCGACAACACCAAGTTTCGCCGACGAGTGGGTGCGGTGC	2640
GCCGCCGGTACCGATACCGCGCTGGCGATGGCGATGGGCCACGTGATCCTGTGCGGAATGT	2700
TACGTCCGTAACAGGTTCCGTTCTTTGTGCGACTATGTGCGCCGCTACACCGACCTGCCG	2760
TTTTTGATCAAGTTGGAAGAGCGGGGCGACCTGCTGGTTCCCGGAAAGTTCTTGACCGCG	2820
GCCGACATTGGTGAAGAAAGTGAGAACGCGGCGTTCAAACCCGCCCTGCTGGATGAGCTT	2880
ACGAATACCGTTGTGTCGCCGAGGGCTCACTGGGATTTCGGTTTCGGTGAGGACGGTGT	2940
GGGAAGTGGAACCTGGACCTGGGTTTCGGTGGTGCCGGCGCTAAGTGTGGAGATGGACAAG	3000

GC

SEQUENZPROTOKOLL

<110> Artus - Gesellschaft fuer molekularbiologische Diagnostik und Entwicklung mbH

<120> Verfahren und Kit zum spezifischen Nachweis von M. tuberculosis

<130> P 65555

<160> 6

<170> PatentIn version 3.1

<210> 1

<211> 3002

<212> DNA

<213> Mycobacterium tuberculosis

<400> 1
ctcgggtgtc aagttgacgc cggcgattac cgctgtctac ctcgtcggcg ttcggcgggt 60
gcatgcggcc gcatttttcgg tggtcgtgtt ccttgccacc gtcggcgtgt cgctactggt 120
cgtcggcgat gaagcccgt actacttcac cgacctgttg ggcgacgcag gccgggttg 180
gcccacgcgc acctccttca atcaatcctg gcgcggcgcg atttcccga ttctcgttca 240
cgacgcgggt tttggtccgc tggttctggc tgcgatcgcc agtacggcgg tattggccat 300
cctggcctgg cgtgcgtcgc acaggtccga tcggctgggc aaactattgg tggtcgagtt 360
gttcggcctg ctgctctcgc cgatctcctg gactcaccac tgggtgtggc tagtgccgct 420
gatgatctgg ctgattgacg ggccagcgcg tgagcgcccg ggcgcccggg ttttgggctg 480
gggctgggtg gtgttgacca tcgtcggcgt gccgtgggtg ctgagctttg ctcaaccgag 540
catctggcaa atcggccggc cgtggtattt ggcttgggccc ggtctggtct acgtggtggc 600
gacgctggcg accttgggct ggatcgccgc ctccgagcgt tacgtgcgca ttcggccgcg 660
gcgcgtggcc aattaggccc caaacattgc gtcgatatcg tgcgccatcg caatgtcgtt 720
ttccgtgata ccacctaccg catgcgtaac cagcgcgaaa gttactgttc gccaacggat 780
atcgatgtcc ggatgatgat ttacctcctc ggctcgctcg gccaccggcg gtacggcgctc 840
gataccggcc ataaacgtcg gaaacttgat tgacctacgc aggacaccac cggcgcgctg 900
ccagccgttg aggtcgtgca gtgcggcgctc gacctgtca tccgttaaca cagccatacc 960
tcgacggtat accgtcacag gtcatgctga atcagatcgt ggttgccgga gccatcgtcc 1020
gcggttgcac ggtccttggtg gcgcaacgcg ttcggccacc ggagtggcg ggtcgttggg 1080
aacttcccgg cggttaaggtc gccgcggcg aaaccgagcg cgccgcgctg gcccgagagc 1140
tcgccgaaga actgggactc gaggtcgccg acctcgcggt gggcgaccgt gtgggagcag 1200
atattgcgtt gaacggcacg acgacgctgc gggcctatcg cgtgcatctg cttggcgggc 1260
aaccgcgtgc gcgtgaccac cgggcgctgt gctgggtgac tccagcgagt ggcgccgaa ctgcacgatg 1320
tcgactgggt accagccgac cgcggtgga ttgcggacct ggcggaacc ctcaacgggt 1380
ccgccgcaga tgtccaccgt cgctgttagg aaaccgacgg tgtggttgac ggtggccgcc 1440
gtcaacttgg ttagaacaac gtgacaaaac gtttaacttg gtttgcatgc ccgtagcgat 1500
tacgatggtt ttctggacgc gtggcgacaa cttccgggca ggacgctgac gccatccat 1560
cgagataccc gatgttgacg agaggggtcc ccgaccggcg ggaccggggc ttgacggggc 1620
caatgcggcg gcgcggcca gccgtaacg tccagcgagt gcggtcgcg gccgagggc 1680
cgccccaca ccgctcatga cgaggagggt catcccgtga ccgttacacc tcacgtcggg 1740
ggaccgctcg aagagctgct ggagcgcagc gggcgcttct tcaccccagg tgagttctcg 1800
gccgacctgc gcaccgtaac ccggcgcgcc ggcgcggaag gtgacgtgtt ctaccgcat 1860
cggtggagtc acgacaaagt ggtccgatcc acgcacggag tcaactgcac cggatcctgc 1920
tcatggaaga tctacgtcaa agacgggatc atcacctggg aaaccagca gaccactac 1980
ccgtcgggtg gccggaccg gccgaatac gagccacgag gttgtccccg tggcgcgctg 2040
ttctcctggg acagctatct gccgacgcgg gtgcgctatc cgtatgcccg gggcggtgctg 2100
gttgagatgt accgggaagc caagaccgcg ctgggagacc cgggtgctggc gtgggcccag 2160
attcaggcgg atcccagagc cagacgcgcg tatcaacagg cccgcggcaa ggggtgggctg 2220
gtccgggtga gctgggcccga ggccagcgag atgttgggcg ccgccacgt gcacaccatc 2280
aagacatacg gccgggaccg ggtcggcgcg ttctcgccga ttcggcgat gtcaatggtc 2340
agccatgcgc cgggggtcccg gttcgtggag ctgatcgggc gcgtgatgac gtcgttctac 2400

gactggtacg	ccgacttgcc	ggtggcctcg	ccgcaggtgt	tcggcgacca	gaccgacgtg	2460
cccgaatccg	gcgactggtg	ggatgcgtcg	tatttggtca	tgtggggctc	caacgtcccg	2520
atcacccgga	cgcccgaacg	acattggatg	gcggaggccc	gttaccgcgg	cgctaaagtc	2580
gttgctcgta	gcccggacta	cgccgacaac	accaagttcg	ccgacgagtg	ggtgcggtgc	2640
gccgccggta	ccgataccgc	gctggcgatg	gcgatgggcc	acgtgatcct	gtcggaatgt	2700
tacgtccgta	accaggttcc	gttcctttgtc	gactatgtgc	gccgctacac	cgacctgccg	2760
tttttgatca	agttggaaaa	gcggggcgac	ctgctggttc	ccggaaagtt	cttgaccgcg	2820
gccgacattg	gtgaagaaa	tgagaacgcg	gcgttcaaac	ccgccctgct	ggatgagctt	2880
acgaataccg	ttgtcgtgcc	gcagggtcca	ctgggattcc	gtttcggtga	ggacggtgtt	2940
gggaagtgga	acctggacct	gggttcgggtg	gtgccggcgc	taagtgtgga	gatggacaag	3000
gc						3002

<210> 2

<211> 19

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 2

aaccgacggt gtggttgac 19

<210> 3

<211> 19

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 3

atctcgatgg atgggcgtc 19

<210> 4

<211> 22

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 4

gtcgccacgc gtccagaaaa cc 22

<210> 5

<211> 18

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 5

cgtgatcgct acgggcat 18

<210> 6

<211> 19

<212> DNA

<213> Mycobacterium

<400> 6

cgtaatcgct acgggcatg 19

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/002911

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER
IPC 7 C12Q1/68

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)
IPC 7 C12Q

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the International search (name of data base and, where practical, search terms used)

EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, EMBL

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US 6 294 328 B1 (FRASER CLAIRE MARIE ET AL) 25 September 2001 (2001-09-25) claims 3,4 SEQ ID Nos. 1 and 2.	16-18, 26, 29
X	DATABASE EMBL 'Online! IBE; 2 May 2001 (2001-05-02), FLEISCHMANN, RD ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis CDC1551, section 83 of 280 of the complete genome" XP002286366 retrieved from WWW.EBI.AC.UK Database accession no. AE006997 the whole document	16-18, 26, 29

☒ Further documents are listed in the continuation of box C.

☒ Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

- *A* document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- *E* earlier document but published on or after the International filing date
- *L* document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- *O* document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- *P* document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- *T* later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- *X* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- *Y* document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- *&* document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

1 July 2004

Date of mailing of the international search report

22/07/2004

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Ulbrecht, M

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No
PCT/EP2004/002911

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	<p>COLE S T: "DECIPHERING THE BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM THE COMPLETE GENOME SEQUENCE" NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB, vol. 393, 11 June 1998 (1998-06-11), pages 537-544.1, XP002144873 ISSN: 0028-0836 the whole document</p>	16-18, 26, 29
P, X	<p>STERMANN M ET AL: "Polymorphic nucleotide within the promoter of nitrate reductase (NargHJI) is specific for Mycobacterium tuberculosis" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 01 JUL 2003 UNITED STATES, vol. 41, no. 7, 1 July 2003 (2003-07-01), pages 3252-3259, XP002286365 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	1-51
A	<p>LACHNIK J ET AL: "Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria" JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, vol. 40, no. 9, September 2002 (2002-09), pages 3364-3373, XP002252656 ISSN: 0095-1137 the whole document</p>	1-51
A	<p>SREEVATSAN SRINAND ET AL: "Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination" PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, vol. 94, no. 18, September 1997 (1997-09), pages 9869-9874, XP002206250 ISSN: 0027-8424 the whole document</p>	1-51

Information on patent family members

PCT/EP2004/002911

Form PCT/ISA/210 (patent family annex) (January 2004)

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/002911

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 7 C12Q1/68

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchiertes Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)
IPK 7 C12Q

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

EPO-Internal, EMBASE, WPI Data, EMBL

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	US 6 294 328 B1 (FRASER CLAIRE MARIE ET AL) 25. September 2001 (2001-09-25) Ansprüche 3,4 SEQ ID Nos. 1 and 2.	16-18, 26,29
X	DATABASE EMBL 'Online! IBE; 2. Mai 2001 (2001-05-02), FLEISCHMANN, RD ET AL.: "Mycobacterium tuberculosis CDC1551, section 83 of 280 of the complete genome" XP002286366 gefunden im WWW.EBI.AC.UK Database accession no. AE006997 das ganze Dokument	16-18, 26,29

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

A Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

E älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

L Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

O Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

P Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

T Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

X Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

Y Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

G Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

1. Juli 2004

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

22/07/2004

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Beauftragter

Ulbrecht, M

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Internationales Aktenzeichen
PCT/EP2004/002911

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	<p>COLE S T: "DECIPHERING THE BIOLOGY OF MYCOBACTERIUM TUBERCULOSIS FROM THE COMPLETE GENOME SEQUENCE"</p> <p>NATURE, MACMILLAN JOURNALS LTD. LONDON, GB,</p> <p>Bd. 393, 11. Juni 1998 (1998-06-11), Seiten 537-544,1, XP002144873 ISSN: 0028-0836 das ganze Dokument</p>	16-18, 26,29
P,X	<p>STERMANN M ET AL: "Polymorphic nucleotide within the promoter of nitrate reductase (NargHJI) is specific for Mycobacterium tuberculosis"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY 01 JUL 2003 UNITED STATES, Bd. 41, Nr. 7, 1. Juli 2003 (2003-07-01), Seiten 3252-3259, XP002286365 ISSN: 0095-1137 das ganze Dokument</p>	1-51
A	<p>LACHNIK J ET AL: "Rapid-cycle PCR and fluorimetry for detection of mycobacteria"</p> <p>JOURNAL OF CLINICAL MICROBIOLOGY, WASHINGTON, DC, US, Bd. 40, Nr. 9, September 2002 (2002-09), Seiten 3364-3373, XP002252656 ISSN: 0095-1137 das ganze Dokument</p>	1-51
A	<p>SREEVATSAN SRINAND ET AL: "Restricted structural gene polymorphism in the Mycobacterium tuberculosis complex indicates evolutionarily recent global dissemination"</p> <p>PROCEEDINGS OF THE NATIONAL ACADEMY OF SCIENCES OF USA, NATIONAL ACADEMY OF SCIENCE. WASHINGTON, US, Bd. 94, Nr. 18, September 1997 (1997-09), Seiten 9869-9874, XP002206250 ISSN: 0027-8424 das ganze Dokument</p>	1-51

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/EP2004/002911

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
US 6294328	B1	25-09-2001	KEINE